

#2



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

REC'D 31 OCT 2003

W.F.U.

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

02017135.1

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

22/10/03

BEST AVAILABLE COPY



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:
Application no.:
Demande n°: 02017135.1

Anmeldetag:
Date of filing: 30/07/02
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
Hoffmann, Kurt, Dr.
4770 Amel
BELGIUM

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Proteinkristallisationsverfahren

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification Internationale des brevets:
B01D9/02

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing:
Etats contractants désignés lors du dépôt:

AT/BG/BE/CH/CY/CZ/DE/DK/EE/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

Proteinkristallisationsverfahren

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Kristallisation von Makromolekülen in einem Dreiphasensystem, entsprechende Vorrichtungen, ein Dreiphasensystem, sowie die Verwendung in automatisierten Kristallisationsverfahren.

Die Aufklärung von dreidimensionalen Strukturen von biologischen Makromolekülen erfolgt am genauesten durch die Röntgenstrukturanalyse. Voraussetzung für die Strukturaufklärung ist, dass die Makromoleküle, wie Proteine oder deren Komplexe, als Einkristalle zur Verfügung stehen.

Üblicherweise wird versucht, Kristalle aus gesättigten Lösungen hochgereinigter Proteine in Anwesenheit einer konzentrierten Lösung entsprechender Salze oder Polymere (Polyethylenglycol usw.) zu gewinnen. Dabei wird den Proteinlösungen das für die Löslichkeit notwendige Wasser in einem bestimmten Zeitablauf mehr oder weniger entzogen, so dass durch eine Fluktuation der Proteinmoleküle Assoziate unterschiedlicher Größe entstehen können. Das Entstehen von Nukleationskeimen ist die Voraussetzung für die Bildung von Kristallen. Diese Vorgänge werden normalerweise empirisch erprobt durch die Auswahl von verschiedenen Salzen in variierenden Ionenstärkebedingungen, pH-Werten, Puffern, Polymeren, organischen Lösungsmitteln, Temperaturen usw., wobei ein Multiparameterproblem vorliegt. (McPherson, A., Crystallization of Biological Macromolecules, Cold Spring Harbor Press, New-York, 1999)

Es stehen verschiedene Kristallisationsverfahren zur Verfügung. Bei sogenannten Batch-Verfahren wird in einem geeigneten Probenträger das zu kristallisierende Protein als konzentrierte Lösung einer vorher deponierten wässrigen Lösung zugegeben oder umgekehrt (Chayen, N. E.; J. Crystal Growth. 1999, 196, 434-41). Da bei diesem System keine Anreicherung der Niederschlagsreagenzien über einen längeren Zeitraum stattfindet, sondern die

- 2 -

Endkonzentrationen bei der Applikation der Proteinlösung direkt eingestellt wird, spricht man von einem „Batchverfahren“. Diese Methode ermöglicht keinen kontinuierlichen Eintritt in die metastabile Region eines Phasendiagramms. Somit geht der große Vorzug der klassischen Kristallisationsverfahren verloren (kinetische Eigenschaften und dynamische Endpunktbestimmung, siehe Figur 1).

Eine abgewandelte Methode zum Batchverfahren besteht darin, an Stelle des reinen Paraffinöls ein z.B. mit Dimethylsiloxan (DMS) versetztes Paraffinöl zu verwenden, so dass eine kontinuierliche Wasserdiffusion aus der Lösung stattfindet. Die Methode erlaubt jedoch nicht die Einstellung eines Endpunktes, da es sich nicht um ein geschlossenes System handelt. Der große Nachteil ist, dass die Proteinlösung über einen bestimmten Zeitraum komplett austrocknet. Sie ist somit für die Kristallogeneese nur bedingt verwendbar (siehe Figur 1).

Dagegen wird bei klassischen Methoden (hanging/sitting-drop) ein Tropfen einer Proteinlösung in einem geschlossenen Gefäß mit einem Reservoir einer wässrigen Lösung einer vorgegebenen höheren Konzentration unter Luftabschluss inkubiert. Mit der Zeit verdunstet Wasser aus dem Tropfen, so dass die Proteinkonzentration kontinuierlich zunimmt. Ein Endpunkt wird erreicht, wenn der Tropfen mit dem Reservoir im Gleichgewicht steht. Über die Konzentration des überschüssigen Reservoirs läßt sich somit der Endpunkt einstellen.

Die Bereitstellung von Kristallen, die für die Strukturaufklärung geeignet sind, ist jedoch oft mit großen Schwierigkeiten verbunden oder nach den bekannten Methoden überhaupt nicht möglich. Häufig kommt es vor, dass eine geordnete Kristallisation aus nicht bekannten Gründen ausbleibt. Das Wechselspiel physikalisch-chemischer Vorgänge, die sich während der Kristallogeneese abspielen, ist bis heute nicht eindeutig beschrieben, da sich die Kristallisation bisher einer konsequenten Analyse entzog. Wenn Kristalle erhalten werden, sind diese oft nicht von ausreichender Größe oder Qualität.

In Anbetracht der großen Fortschritte, die in den letzten Jahren bei der Aufklärung von Gen- und Proteinsequenzen durch automatisierte Verfahren

- 3 -

erzielt wurden, ist es wünschenswert, die zahlreichen neuen Proteine, die jetzt expremiert werden können, systematisch mit automatisierten Verfahren zu untersuchen. Auch haben Teilbereiche der Röntgenstrukturanalyse in den letzten Jahren gewaltige Effizienzsteigerungen erfahren. Hierzu trug unter anderem die Bereitstellung von Röntgenstrahlungsquellen hoher Brillanz (Synchrotrone), sowie die Bereitstellung effizienter Hard- und Software für die Dateninterpretation bei. Die bekannten Verfahren zur Kristallisation von biologischen Makromolekülen konnten bislang jedoch nicht auf befriedigende Art und Weise als automatisierte Hochdurchsatzverfahren durchgeführt werden (Chayen, N. E. und Saridakis, E.; Acta Cryst. 2002, D58, 921-27). Es besteht daher ein starkes Bedürfnis nach Verfahren zur Kristallisation von Proteinen, die einfach automatisiert werden können und somit ein Screening der mittlerweile verfügbaren Proteine und die systematische Erzeugung von Kristallen ermöglichen.

Bei automatisierten Diffusionsexperimenten nach der Hanging-Drop- oder Sitting-Drop-Methode werden geschlossene Systeme durch silikonisierte Glasdeckel oder mit selbstklebenden transparenten Folien verschlossen. Bei der Hanging-Drop-Methode muss ein Tropfen jeweils auf die Unterseite eines Deckels pipettiert werden, der Deckel umgedreht werden und ohne Beeinträchtigung des Tropfens über einem Flüssigkeitsreservoir aufgesetzt werden, das luftdicht verschlossen werden muss. Für den Roboter ist dies mit relativ vielen aufwändigen Arbeitsschritten verbunden. Derartige automatisierten Verfahren sind nicht attraktiv hinsichtlich Kosten, Geschwindigkeit und Reproduzierbarkeit und lassen sich nur schlecht mit kleinsten Probenvolumina realisieren (siehe auch Chayen und Saridakis, 2002).

Bei automatisierten Batch-Verfahren werden von Robotern die in den entsprechenden Screening-Ansätzen verwendeten Lösungen z.B. unter Paraffinöl deponiert. Die wässrige Lösung ist somit direkt vor Ausdunstung geschützt. Dies ist insbesondere bei der Verwendung von kleinsten Probenvolumina wichtig, da durch geringste Wasserverluste die eingestellten Konzentrationen erheblich variieren können und somit die Reproduzierbarkeit beeinflussen (Störeinflüsse). Solche automatisierten Verfahren sind mit den

- 4 -

üblichen Nachteilen von Batchverfahren verbunden, da keine Konzentrationsänderung und im Falle einer Konzentrationsänderung kein Endpunkt einstellbar ist. Die Anwendung adaptiver, auf statistischer Analyse beruhender Kristallisationsverfahren setzen jedoch eine genaue Kenntnis der Endkonzentration voraus.

Der Erfindung liegt das Problem zugrunde, ein Kristallisationsverfahren bereitzustellen, dass die benannten Nachteile der Verfahren nach dem Stand der Technik überwindet. Insbesondere soll ermöglicht werden, mit relativ wenig Aufwand und relativ hoher Erfolgswahrscheinlichkeit möglichst homogene und große Kristalle von Makromolekülen zu erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren soll auch als automatisiertes Verfahren zum Screening von Kristallisationsansätzen geeignet sein. Insbesondere soll das automatisierte erfindungsgemäße Verfahren für Roboter einfach und mit relativ wenigen Arbeitsschritten durchführbar sein und die beschriebenen Nachteile automatisierter Kristallisationsverfahren überwinden.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem wird überraschenderweise gelöst durch ein Verfahren zur Kristallisation von Makromolekülen unter Verwendung eines Gefäßes, enthaltend eine untere wässrige und eine mittlere Phase,

wobei eine wässrige Lösung der Makromoleküle in die mittlere Phase gegeben wird,

wonach eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase über die mittlere Phase geschichtet wird,

oder

eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase über die mittlere Phase geschichtet wird,

wonach eine wässrige Lösung der Makromoleküle in die mittlere Phase und/oder obere Phase gegeben wird,

und inkubiert wird.

Die wässrige Lösung der Makromoleküle bildet dabei eine vierte Phase, die sich nicht unmittelbar mit der unteren Phase vermischt. Im allgemeinen wird die vierte Phase in einer Menge zugegeben, dass sie einen Tropfen bildet. Vorzugsweise wandert die vierte Phase nach Einbringen in das Gefäß zur Phasengrenze zwischen der unteren und mittleren Phase. Eine Vermischung mit der unteren Phase, die ja ebenfalls eine wässrige Phase ist, findet nicht statt. Vielmehr verbleibt die vierte Phase mindestens so lange im System, bis der Kristallisationsprozess einsetzt. In alternativen Ausführungsformen positioniert sich die vierte Phase an der Phasengrenze der mittleren und oberen Phase oder innerhalb der mittleren Phase. Entscheidend ist, dass keine unmittelbare Vermischung mit der unteren wässrigen Phase stattfindet.

Die Phasen des Kristallisationssystems werden schematisch anhand von Figur 2 und photographisch durch Figur 3 verdeutlicht. In Figur 3 ist eine vierte tropfenförmige Phase zwischen den Phasengrenzen der mittleren und oberen Phasen positioniert. Die Phasengrenze ist in Figur 3 nicht deutlich zu erkennen, jedoch zeigt Figur 4 eine Großaufnahme einer vierten Phase an der Phasengrenze der mittleren und unteren Phase. In diesem metastabilen Zustand verbleibt die vierte Phase über einen längeren Zeitraum und dringt nicht in die untere wässrige Phase ein.

Die vierte Phase vermischt sich solange nicht vollständig mit der unteren Phase, bis die Kristallisation in der vierten Phase oder an einer Phasengrenze zur vierten Phase einsetzt. Vorzugsweise ist die vierte Phase für mindestens 6, 12 oder 24 Stunden unterscheidbar, besonders bevorzugt für mindestens 2, 4, 6, 14, 21 oder 30 Tage.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das verwendete Gefäß so ausgestaltet, dass die vierte Phase nicht in Kontakt mit der unteren Phase kommen kann. Dabei ist die vierte Phase vorzugsweise in einer Ausbuchtung lokalisiert. Figur 6 zeigt schematisch, wie eine solche Ausführungsform erfindungsgemäß realisiert werden kann. Der Tropfen kann aufgrund einer physischen Barriere nicht in die untere Phase gelangen. Erfindungsgemäß ist es möglich, in einem Dreiphasensystem mehr als eine Makromoleküllösung als

- 6 -

getrennte Phase zur Kristallisation zu bringen. Figur 7 zeigt eine erfindungsgemäße Ausgestaltung des Gefäßes mit drei Vertiefungen in denen jeweils eine räumlich von der unteren Phase getrennte vierte Phase vorliegt. Derartige Ausgestaltungen sind erfindungsgemäß auch als Multiwellplatten realisierbar, die die gleichzeitige oder sequentielle Untersuchung einer Vielzahl von Proben erlauben. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Dreiphasensystem vor Zugabe der vierten Phase erstellt. In einer weiteren Ausführungsform wird die vierte Phase in den Ausbuchtungen zuerst vorgelegt und anschließend das Dreiphasensystem erstellt. In einem Screeningtest wird dann die Proteinlösung der wässrigen vierten Phase in einer der Ausbuchtungen zugegeben und kann durch Ausdunstung von H_2O mit der unteren Phase wieder ins Gleichgewicht kommen.

Durch die obere Phase findet über die Dauer des Kristallisationsvorgangs im wesentlichen keine Diffusion von H_2O aus dem Gefäß statt. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die obere Phase Paraffinöl. Es kann aber jedes andere Öl oder jede andere Flüssigkeit verwendet werden, die in der Lage ist, als obere Phase die Ausdunstung von Wasser aus dem System einzuschränken.

Die mittlere Phase wird so ausgewählt, dass eine Diffusion von H_2O von der vierten Phase in die erste Phase stattfindet. Daher nimmt die Konzentration des Makromoleküls in der vierten Phase kontinuierlich zu. Da das Gesamtsystem im wesentlichen kein Wasser verliert, kann durch die Auswahl der Zusammensetzung der wässrigen unteren Phase ein Endpunkt für die Kristallisation eingestellt werden, bei dem die untere und die vierte Phase sich im Gleichgewicht befinden.

Die mittlere Phase kann auch aus komplexen Gemischen, z.B. verschiedener Viskositäten und/oder chemischer Natur bestehen. Des weiteren darf die mittlere Phase die diffusionshemmenden Eigenschaften der oberen Phase nicht unverhältnismäßig mindern.

Die mittlere Phase enthält in bevorzugten Ausführungsformen Hydroxy-terminiertes Dimethylsiloxan und/oder Phenylmethyl-Polysiloxane,

- 7 -

Insbesondere Phenylmethyl-Dimethyl-Polysiloxane. Bei der Wahl der Flüssigkeit für die mittlere Phase spielt insbesondere deren Viskosität sowie im Falle des Phenylmethyilsilikonöls das Verhältnis der Methyl- zu den Phenylgruppen eine Rolle.

Die untere wässrige Phase enthält vorzugsweise Salze, Puffersubstanzen, Polymere und/oder organische Lösungsmittel.

Die wässrige Lösung des Makromoleküls enthält in bevorzugten Ausführungsformen Salze, Puffersubstanzen, Polymere und/oder organische Lösungsmittel.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die wässrige Lösung des Makromoleküls abgesehen vom Makromolekül selbst die gleichen Bestandteile wie die untere wässrige Phase, jedoch in geringerer Konzentration.

Die Makromoleküle der vierten Phase, die erfindungsgemäß kristallisiert werden, sind in bevorzugten Ausführungsformen Proteine, RNA, Komplexe von Makromolekülen, Proteinkomplexe, Protein/Ligandenkomplexe, DNA/Ligandenkomplexe, Protein/RNA-Komplexe oder Protein/DNA-Komplexe. Allgemein können erfindungsgemäß Makromoleküle, sowie sonstige größere Moleküle, biologischen oder synthetischen Ursprungs, kristallisiert werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch Kristalle von Makromolekülen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt werden. Das Verfahren der Erfindung ist auch ein Herstellungsverfahren für Kristalle von Makromolekülen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Strukturen von Makromolekülen, die bei der Untersuchung von Kristallen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugt wurden, ermittelt werden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Dreiphasensystem zur Kristallisation von Makromolekülen, bei dem in einem Gefäß drei Phasen übereinander vorliegen, wobei diese eine untere wässrige Phase, eine mittlere Phase und eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase sind. Die drei Phasen sind vorzugsweise flüssig. Erfindungsgemäß sind

- 8 -

jedoch auch andere Ausführungsformen durchführbar. So kann die untere Phase beispielsweise gelartig sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den Erhalt von relativ gleichmäßigen und großen Kristallen. Das Verfahren ist einfach, schnell durchführbar und in hohem Masse reproduzierbar, wobei das Problem der Verdunstung auch bei Verwendung geringer Proteinmengen nicht gegeben ist. Je nach Ausführungsform bestehen keine oder nur geringe Wandkontakte mit dem Probenträger, was zu einer geringeren Nukleationsrate und somit zu größeren Kristallen führt. Die Proteintropfen besitzen eine homogene Form und weisen im Vergleich zu klassischen Verfahren weniger Störeffekte auf, was Verfahren der Bildaufnahme- und Bildbewertung vereinfacht. Durch die Wahl der zweiten Phase steht ein zusätzlicher Parameter bezüglich der Dynamik der Einstellung des Endpunktes zur Verfügung, der die Nukleationsrate mitbestimmt.

Die Erfindung betrifft insbesondere auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, der Vorrichtung und/oder des Dreiphasensystems zur automatisierten Kristallisation oder zum automatisierten Screening. Das erfindungsgemäße Verfahren ist in hohem Masse geeignet für die Verwendung im Rahmen automatisierter, Roboter-gestützter Verfahren. Es sind im Vergleich zu den klassischen Methoden deutlich weniger Arbeitsschritte nötig. Der Roboter muss lediglich die Lösungen nacheinander pipettieren. In einer bevorzugten Anwendungsform sind die Lösungen bereits vorpipettiert und die Lösung des Makromoleküls muß lediglich zugefügt werden. Die Applikation von Glasdeckeln, das Drehen der Deckel, oder die Versiegelung des Systems mit Folie oder ähnlichem sind nicht mehr erforderlich. Trotzdem geht die Kristallisation mit einem dynamisch einstellbaren Endpunkt einher.

Gegenstand der Erfindung ist auch eine Vorrichtung zur Kristallisation von Makromolekülen, bei der eine Vielzahl von Probengefäßen zu einem Probenträger angeordnet sind (Figur 8), wobei der Probenträger einen durchgängigen Rand aufweist, der höher angeordnet ist als die Öffnungen der

- 9 -

Probengefäße (Figur 9). In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Probengefäßen jeweils mindestens eine erhöhte Ausbuchtung auf (Figur 9). Diese Ausführungsformen eignen sich insbesondere für die Automatisierung unter Verwendung von Robotern. Es kann eine beliebige Anzahl von Probengefäßen auf einem Probenträger angeordnet werden (in Figur 8 sind 96 Proben angeordnet). Der Probenträger ist gekennzeichnet durch einen erhöhten Rand. Dadurch wird die robotergestützte Durchführung des Verfahrens stark vereinfacht: Es wird in jedes Probengefäß die untere wässrige Phase gegeben. Danach wird diese mit der mittleren Phase überschichtet, die vorzugsweise alle Probengefäße über die Höhe der Ausbuchtung hinaus, jedoch unter den Rand der einzelnen Probengefäße auffüllt. Danach erfolgt die Überschichtung des gesamten Systems mit der oberen Phase. Dadurch werden störende Miniskuseffekte an der Oberfläche unterbunden.

Die Applikation der vierten Phase erfolgt dann jeweils in oder über die Probengefäße wie beschrieben. Der Rand des Probenträgers ist ausreichend hoch, um die obere Phase aufzunehmen. Vorzugsweise ist der Anteil des erhöhten Randes an der Gesamthöhe des Probenträgers 2-50%, bevorzugt 5 bis 30%, besonders bevorzugt 10 bis 20%.

Bei der Automatisierung des Verfahrens können die einzelnen Probengefäße Ausbuchtungen ausweisen (Figur 9). In einem Probengefäß können eine oder mehrere Ausbuchtungen vorhanden sein, z.B. drei Ausbuchtungen wie in Figur 7. Es können auch eine Vielzahl von Ausbuchtungen neben einem Reservoir angeordnet sein.

Durch diese erfindungsgemäßen Ausführungsformen lassen sich eine Vielzahl von Arbeitsschritten, auch Pipettierschritten, einsparen, was die Verwendung als automatisierten Prozess stark erleichtert. Das Verfahren ist ähnlich einfach automatisiert durchführbar wie Batchverfahren nach dem Stand der Technik, ermöglicht jedoch eine dynamische Einstellung eines Endpunktes und eines metastabilen Zustandes. Des weiteren können zeitlich versetzte Testverfahren an mehreren Proteinen realisiert werden, wobei das Protein einer Ausbuchtung zugegeben wird, in die bereits vorher die wässrige Lösung (vierte Phase)

- 10 -

vorgelegt wurde. Dies ermöglicht einen verringerten Verbrauch von Chemikalien und Probenträgern.

Bevor ein erfindungsgemäßes Dreiphasensystem etabliert wird, ist es nötig, die mittlere und die obere Phase so auszuwählen, dass saubere Phasengrenzen erhalten werden und dass die Reihenfolge der Phasen (unten/Mitte/oben) sich wie gewünscht, unter anderem durch Adhäsions- und Kohäsionskräfte, einstellt.

Die obere Phase muss eine geringere Dichte als die Lösung des Makromoleküls aufweisen und muss gegenüber H_2O diffusionshemmende Eigenschaften besitzen. Geeignet ist insbesondere Paraffinöl.

Zum Testen der mittleren Phase werden die einzelnen Flüssigkeiten für die mittlere Phase jeweils mit einer identischen Menge der oberen Phase überschichtet und anschließend bei Raumtemperatur inkubiert. Geeignete Flüssigkeiten bilden eine über einen längeren Zeitraum stabile Phasengrenze aus.

Um die Dampfdurchlässigkeit der mittleren Phase zu testen, wird die bekannte Kristallisation eines Makromoleküls in einem offenen System mit unterer wässriger Lösung des Makromoleküls und überschichteter mittlerer Phase untersucht (ohne obere Phase). Die verdünnte Lösung des Makromoleküls wird gefiltert, in ein Kristallisationsgefäß gegeben und mit der zu testenden mittleren Phase überdeckt. Anschließend wird der Ansatz über einen Zeitraum von mehreren Stunden bis mehreren Tagen beobachtet. Falls die mittlere Phase Wassermoleküle aus der Lösung des Makromoleküls ausdiffundieren lässt, entstehen je nach Diffusionsoffenheit und Schichtdicke Kristalle. Wenn die mittlere Phase die Diffusion von Wasser nicht zulässt und daher erfindungsgemäß nicht geeignet ist, bilden sich nach mehreren Tagen keine Kristalle.

Da die Lösung des Makromoleküls meist auf einer Elektrolytlösung basiert, muß außerdem das Verhalten der mittleren Phase in Bezug zur wässrigen Phase bewertet und sichergestellt werden, dass sich die für die mittlere Phase

- 11 -

verwendete Flüssigkeit im wesentlichen nicht mit der wässrigen Phase vermischt und mit dieser kompatibel ist.

Um den Einfluss einer diffusionsoffenen mittleren Phase auf die diffusionshemmenden Eigenschaften der oberen Phase zu testen, wird zusätzlich mit einer Schicht von Paraffinöl beschichtet, die mindestens so dick sein sollte wie die Schicht der mittleren Phase. Wenn die mittlere Phase die diffusionshemmenden Eigenschaften der oberen Phase nicht substantiell beeinflusst, ist keine oder zumindest eine erheblich verzögerte Bildung von Proteinkristallen zu beobachten.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1: Test der Löslichkeit der mittleren Phase in der oberen Phase

Es wird Paraffinöl (Paraffin dünnflüssig, Merck; Bestellnummer: 1.07174.1000) als obere Phase verwendet nach einer kompatiblen mittleren Phase gesucht. Anstelle des Paraffinöls können andere Flüssigkeiten verwendet werden, die dienen diffusionshemmende Eigenschaft und eine entsprechende Dichte aufweisen.

Tabelle 1 enthält eine Auflistung der getesteten Flüssigkeiten, die verschiedene Polysiloxane, Zufalls-Copolymere und ein Block-Copolymer umfasst.

Tabelle 1:

I	Poly(dimethylsiloxan-Co-Methylphenylsiloxan), Trimethylsilyl-terminiert; Phenylmethylsiloxan-Anteil: ~50% ; Viskosität bei 25°C: 100 mm ² /s (Siliconöl AP100, Wacker-Chemie GmbH)
II	Poly(dimethylsiloxan-Co-Methylphenylsiloxan), Trimethylsilyl-terminiert; Phenylmethylsiloxan-Anteil: ~50 % ; Viskosität bei 25°C: 200 mm ² /s (Siliconöl AP200, Wacker-Chemie GmbH)
III	Poly(dimethylsiloxan-Co-Methylphenylsiloxan), Trimethylsilyl-terminiert; Phenylmethylsiloxan-Anteil: ~50 % ; Viskosität bei 25°C: 500 mm ² /s

- 12 -

	(Siliconöl AP500, Wacker-Chemie GmbH)
IV	Poly(dimethylsiloxan-Co-Methylphenylsiloxan), Trimethylsilyl-terminiert; Phenylmethylsiloxan-Anteil: <50 % ; Viskosität bei 25°C: 20 mm ² /s (Siliconöl AR20, Wacker-Chemie GmbH)
V	Poly(dimethylsiloxan-Co-Methylphenylsiloxan), Trimethylsilyl-terminiert; Phenylmethylsiloxan-Anteil: <50 % ; Viskosität bei 25°C: 200 mm ² /s (Siliconöl AR200, Wacker-Chemie GmbH)
VI	Poly(dimethylsiloxan-Co-Methylphenylsiloxan), Trimethylsilyl-terminiert; Phenylmethylsiloxan-Anteil: <50 % ; Viskosität bei 25°C: 1000 mm ² /s (Siliconöl AR1000, Wacker-Chemie GmbH)
VII	Poly(dimethylsiloxan), Hydroxy-terminiert, ca. 25 cSt bei 25°C (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 48,193-9)
VIII	Poly(dimethylsiloxan), Hydroxy-terminiert, ca. 65 cSt bei 25°C (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 48,195-5)
IX	Poly(dimethylsiloxan), Hydroxy-terminiert, 90-150 cSt bei 25°C (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 43,297-0)
X	Polydimethylsiloxan, Trimethylsilyl-terminiert Hampton-Research, DMS Oil, Bestellnummer: HR2-593
XI	Poly-3,3,3-Trifluorpropylmethylsiloxan Hampton-Research, FMS Oil, Bestellnummer: HR2-595
XII	((N-Pyrrolidonpropyl)-Methylsiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer (ABCR, Bestellnummer: YBD-125, Gelest Inc.)
XIII	Poly[dimethylsiloxan-Co-Methyl(3-Hydroxypropyl)siloxan]-graft- Poly(ethylenglycol)methylether (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 48,239-0)

- 13 -

XIV	Poly[dimethylsiloxan-Co-Methyl(3-Hydroxypropyl)siloxan]-Graft-Poly(ethylen/propylenglycol)methylether (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 48,034-7)
XV	Poly[dimethylsiloxan-Co-Methyl(3,3,3-Trifluorpropyl)siloxan] (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 48,257-9)
XVI	Dimethylsiloxan - Ethylenoxid Blockcopolymer (ABCR, Bestellnummer: DBE-224, Gelest Inc.)

In runden Glasgefäßen mit einem Innendurchmesser von 6,5 mm werden je 500 Mikroliter der zu testenden Flüssigkeit gegeben, mit je 500 Mikroliter Paraffinöl bedeckt und bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Flüssigkeiten bilden Initial zum Paraffin eine scharfe Phasengrenze. Nach zwei Stunden hat die Phasengrenze für die Flüssigkeiten IV und X bereits an Schärfe verloren, bedingt durch ein ineinanderdiffundieren beider Flüssigkeiten. Nach 24 Stunden ist dies ansatzweise auch für die Flüssigkeit I der Fall. Somit stellen die Flüssigkeiten II, III, V, VI, VII, VIII, IX, XI, XII, XIII, XIV, XV und XVI potentielle Kandidaten für die mittlere Phase des hier beschriebenen Verfahrens dar. Die Flüssigkeiten IV, X und bedingt I fallen aus dem hier vorgestellten Selektionsverfahren aus. Für die Flüssigkeit X ist dies nicht verwunderlich, da es sich um das in den modifizierten Batchverfahren verwendete Polydimethylsiloxan (DMS) handelt, was dem Paraffinöl beigesetzt wird um dieses diffusionsoffener zu machen. Die Flüssigkeit X wurde exemplarisch berücksichtigt.

Beispiel 2: Test der Diffusionseigenschaften der mittleren Phase

Die zu testenden mittleren Phasen werden mit Wasser abgesättigt. Dazu wird der zu testenden Flüssigkeit 5 % (v/v) Wasser zugegeben, vermischt, zentrifugiert und über mehrere Tage inkubiert. Die Absättigung dient dazu, die Bildung von Proteinkristallen durch Wasserentzug der zu testenden mittleren

- 14 -

Phase zu unterbinden. Die Flüssigkeiten XIII, XIV und XVI erwiesen sich als wenig kompatibel mit einer wässrigen Lösung sind.

Eine Lysozymlösung (25 mg/ml) wird wie folgt hergestellt: 50 mg Lysozym (Lysozyme, Sigma; Bestellnummer: L-7651) werden komplett in 1 ml Wasser aufgelöst, filtriert und mit 1 ml der folgenden Lösung versetzt: 5 % NaCl, 100 mM NaOAc pH 4.0, 0.02 % NaN_3 .

In eine 96-well Mikrotiterplatte werden pro Probengefäß 10 Mikroliter der Lysozymlösung deponiert und mit je 80 Mikroliter der in Beispiel 1 genannten Flüssigkeiten Nummer: II, III, V, VI, VII, VIII und IX überdeckt. Parallel dazu wird der gleiche Ansatz erstellt, und weiter mit 100 Mikroliter Paraffinöl überdeckt. Beide Ansätze werden bei 22°C inkubiert und über einen Zeitraum von mehreren Wochen beobachtet. Bei der Wahl der getesteten Flüssigkeiten wurden die kostengünstigen potentiellen Flüssigkeiten ausgewählt.

Die folgende Tabelle gibt die Zeiten in Tagen wieder, nach denen Lysozymkristalle beobachtet werden konnten:

Flüssigkeit Nummer	ohne Paraffinöl	mit Paraffinöl
II	~8	~22
III	~8	~22
V	~6	~22
VI	~7	~22
VII	~0,5	~22
VIII	~1	~22
IX	~1	~22

Somit können verschiedene Diffusionseigenschaften der Flüssigkeiten charakterisiert werden und deren Einfluss auf die Diffusionseigenschaften des Paraffinöls ausgeschlossen werden.

Beispiel 3: Diffusionseigenschaften der Hydroxy-terminierten Polydimethylsiloxane

Anstelle der in Beispiel 2 genannten Mikrotiterplatten werden Glasgefäße mit einem Innendurchmesser von 6,5 mm verwendet und mit 100 Mikroliter der aus Beispiel 1 genannten Flüssigkeiten Nummer VII, VIII oder IX befüllt. Parallel dazu wird der gleiche Ansatz erstellt, und weiter mit 100 Mikroliter Paraffinöl überdeckt. Anschließend werden den Glasröhrchen 5 Mikroliter der in Beispiel 2 beschriebenen Lysozymlösung beigelegt. Diese wandert zum Boden des Gefäßes. Innerhalb weniger Stunden wird bei Flüssigkeit VII deren leichte Eintrübung im mit Paraffin überdeckten Ansatz beobachtet. Nach mehreren Stunden ist diese Eintrübung ebenfalls für die mit Paraffinöl überdeckten Flüssigkeiten VIII und IX sichtbar. Diese Trübung bleibt für die nicht mit Paraffinöl überdeckten Ansätze aus. Wird den mit Paraffinöl überdeckten Ansätzen keine wässrige Phase beigelegt, bleibt eine Eintrübung aus. Wird an Stelle der Lysozymlösung reines Wasser verwendet, wird ein ähnliches Verhalten beobachtet. Die gemäß Beispiel 3 durchgeführte Absättigung der Flüssigkeiten ist insbesondere für die Hydroxy-terminierten Dimethylsiloxane wichtig.

Beispiel 4: Kristallisation von Lysozym im Vierphasensystem:

Aufbau des Vierphasensystems: Als untere Phase werden in Glasgefäßen mit 6,5 mm Innendurchmesser je 500 Mikroliter einer Lösung von 5 % NaCl, 100 mM NaOAc pH 4.0, 0.02 % NaN_3 gegeben. Die Lösung bestimmt somit den Endpunkt für die Kristallisation des Lysozyms. Anschließend werden als mittlere Phase 100 Mikroliter der in Beispiel 1 genannten Flüssigkeit Nummer V zugegeben. Überdeckt wird das ganze mit 100 Mikroliter Paraffinöl als obere Phase.

Ein Mikroliter einer Lysozymlösung gemäß Beispiel 2 wird mittels einer Pipette unter die Paraffin/Luft Phasengrenze in das Vierphasensystem appliziert und

wandert bedingt durch den Dichteunterschied bis zur Silikonöl/Paraffinöl Phasengrenze. Anschließend wandert die Proteinklösung langsam zur Phasengrenze untere Phase/Silikonöl und verbleibt dort üblicherweise als stabile vierte Phase in Form eines Tropfens. Der Endpunkt der Konzentration wird durch die Zusammensetzung der unteren Phase bestimmt. Gelegentlich wird auch eine unerwünschte Vereinigung der vierten Phase mit der unteren Phase beobachtet. Es bilden sich Proteinkristalle (Figur 4). Verwendet man anstelle der Flüssigkeit V die Flüssigkeit VI, so stabilisiert sich der Tropfen in der Regel an der Phasengrenze Paraffinöl/Silikonöl. Dies gilt insbesondere für Tropfen <1 Mikroliter. Es bilden sich ebenfalls Proteinkristalle.

Die in diesem Beispiel genannten Flüssigkeiten Nummer V und VI sind Copolymere. Sie unterscheiden sich in der Viskosität und somit in der Längenverteilung der jeweiligen Polymerketten. Es ist somit ersichtlich, dass die Länge- und Längenverteilung des Phenylmethyloxans, sowie das Volumen der Proteinklösung einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Verhalten des Systems haben. Diese Parameter können je nach Anwendung eingestellt und optimiert werden. Auch über die Zugabe von Zusatzstoffen (z.B. Stabilisatoren, Block-Copolymere, insbesondere Di- und/oder Triblock-Copolymere) kann das System weiter optimiert werden.

Bei Verwendung von Glasröhrchen oder Glaskapillaren kann die Doppelbrechung der Proteinkristalle zur Detektion genutzt werden. Der Boden des Gefäßes muss optisch homogen sein. Hierzu wird polarisiertes Licht mit einem 90° versetzten Analysator zur Totalextinktion gebracht, wobei Kristalle nicht-kubischer Symmetrie je nach Ausrichtung ein Lichtsignal zeigen (Figur 5). Des weiteren bilden sich bei der Verwendung von Glas an der Phasengrenze unten/Mitte sowie Mitte/oben jeweils ein konkaver Meniskus aus, was zu einer Zentrierung des Tröpfchens führt (siehe Figur 4). Dies ist für die Analyse der Kristallisationsexperimente von Vorteil. Die Oberflächeneigenschaften des Gefäßes können auf diese Art so ausgewählt werden, dass sie die Kristallisation vorteilhaft beeinflussen.

Beispiel 5: Kristallisation im Vierphasensystem mit räumlicher Abtrennung der Proteinlösung von der unteren Phase

Ein Dreiphasensystem wird in einer 96-well Kristallisationsplatte (Greiner Bio-one, Protein Kristallisationsplatte, 96 well; Bestellnummer 609120) wie oben beschrieben etabliert. Dabei ist es wichtig, dass die untere Phase nicht über die Ausbuchtung hinausragt (siehe Figur 6). Die mittlere Phase wird dann appliziert, bis der gesamte Querschnitt einer Probenposition bedeckt ist. Anschließend wird mit Paraffinöl überdeckt (obere Phase, siehe Figur 7). Die mittlere Phase kann auch nach der oberen Phase appliziert werden.

Als Richtwerte gelten folgende Volumina: 300 Mikroliter Ausfällungsreagenz, 90 Mikroliter der mittleren Phase, 120 Mikroliter Paraffinöl und 2 Mikroliter Proteinlösung.

Die Ansprüche an die mittlere Phase sind bezüglich der Stabilisierung des Proteintropfens weniger stringent als bei Beispiel 4. Zwei Mikroliter einer in Beispiel 2 beschriebenen Lysozymlösung wird so appliziert, dass sie in die Ausbuchtung des Gefäßes positioniert ist oder dorthin wandert. Sie bildet einen Tropfen aus, der von der mittleren Phase und der Gefäßwand umgeben ist. Die Figur 7 zeigt ein Kristallisationsexperiment bei dem die Flüssigkeit IX als mittlere Phase verwendet wurde. Proteinkristalle bilden sich im Falle der Flüssigkeit IX nach zwei Tagen. Bei Verwendung der Hydroxy-terminierten-Polysiloxane (Flüssigkeiten VII, VIII und IX) kann des öfteren ein Aufreißen der oberen Paraffinschicht beobachtet werden, insbesondere wenn geringere Volumina des Paraffinöl verwendet werden. Die hier verwendete Kristallisationsplatte lässt jedoch keine Applikation von größeren Mengen Paraffinöl zu. Dagegen erlaubt die Verwendung eines Probenträgers mit einem erhöhten Rand die Applikation einer ausreichenden Schicht Paraffinöls über den gesamten Probenträger.

Figuren:

Figur 1 zeigt vereinfacht und schematisch das unterschiedliche Verhalten der gängigen Kristallisationsverfahren in einem Phasendiagramm. L, M und U

- 18 -

bezeichnen jeweilig die lösliche, metastabile und instabile Region des Phasendiagramms.

Figur 2 zeigt den schematischen Aufbau eines erfindungsgemäßen Dreiphasensystems mit einer tropfenförmigen vierten Phase, die an der Phasengrenze zwischen der oberen und mittleren Phase lokalisiert ist. Erfindungsgemäß findet eine Diffusion von Wasser nach oben im wesentlichen nicht statt. I, II und III entsprechen der oberen, mittleren und unteren Phase.

Figur 3 zeigt eine Photographie von drei erfindungsgemäßen Dreiphasensystemen, bei denen jeweils die Lösung des Makromoleküls tropfenförmig zwischen der oberen und mittleren Phase lokalisiert ist.

Figur 4 zeigt in Großaufnahme eine Lösung des Makromoleküls, die sich an der Phasengrenze zwischen der mittleren und unteren Phase positioniert hat.

Figur 5 zeigt für den selben Ansatz wie Figur 4 in Großaufnahme die Kristalle, die sich in einem erfindungsgemäßen Dreiphasensystem gebildet haben. Die Lysozymkristalle sind mit polarisiertem Licht und mit einem um 90° versetzten Analysator detektierbar.

Figur 6 zeigt eine Ausführungsform, bei der die Lösung des Makromoleküls durch eine Ausbuchtung im Gefäß daran gehindert ist, sich weiter zu der unteren Phase hin zu bewegen. Die Diffusion von H₂O erfolgt in Pfeilrichtung. I, II und III entsprechen der oberen, mittleren und unteren Phase.

Figur 7 ist ein Photo von oben auf ein erfindungsgemäßes System, bei dem drei Ausbuchtungen gemeinsam an einem Reservoir angeordnet sind. In der mittleren Ausbuchtung sind deutlich sichtbare Kristalle entstanden. Die Ausbuchtungen sind mit dem Reservoir über eine durchgängige mittlere Phase verbunden, durch die H₂O zum Reservoir diffundieren kann.

Figur 8 zeigt die Aufsicht eines erfindungsgemäßen Probenträgers zur automatisierten Durchführung des Kristallisationsverfahrens.

Figur 9 zeigt einen Teil eines Querschnitts durch einen erfindungsgemäßen Probenträger. Bei der gezeigten Ausführungsform sind in den einzelnen Probegefäßen, von denen drei in einer Reihe dargestellt sind, gegenüber dem

- 19 -

Gefäßboden erhöhte Ausbuchtungen vorhanden, in die oder über die die Lösung des Makromoleküls appliziert wird. Der Probenträger ist durch einen erhöhten Rand gekennzeichnet, der es ermöglicht, die einzelnen Probengefäße mit der mittleren Phase zu befüllen und die mittleren Phasen mit einer durchgängigen oberen Phase zu überschichten. Dadurch wird der Vorgang der Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Dreiphasensystems beträchtlich vereinfacht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kristallisation von Makromolekülen unter Verwendung eines Gefäßes, enthaltend eine untere wässrige und eine mittlere Phase,
wobei eine wässrige Lösung der Makromoleküle in die mittlere Phase gegeben wird,
wonach eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase über die mittlere Phase geschichtet wird,
oder
eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase über die mittlere Phase geschichtet wird,
wonach eine wässrige Lösung der Makromoleküle in die mittlere Phase und/oder obere Phase gegeben wird,
und inkubiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung der Makromoleküle eine vierte Phase bildet, die sich nicht unmittelbar mit der unteren Phase vermischt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die vierte Phase nach Einbringen in das Gefäß zur Phasengrenze zwischen der unteren und mittleren Phase oder zur Phasengrenze zwischen der mittleren und oberen Phase wandert.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Gefäß so ausgestaltet ist, dass die vierte Phase nicht in Kontakt mit der unteren Phase kommt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die vierte Phase in einer Ausbuchtung lokalisiert ist.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sich die vierte Phase solange nicht vollständig mit der unteren Phase vermischt, bis die Kristallisation in der vierten Phase oder an einer Phasengrenze zur vierten Phase einsetzt.
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass durch die obere Phase über die Dauer des Kristallisationsvorgangs im wesentlichen keine Diffusion von H_2O aus dem Gefäß stattfindet.
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die obere Phase Paraffinöl enthält.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die mittlere Phase so ausgewählt ist, dass eine Diffusion von H_2O von der vierten Phase in die untere Phase stattfindet.
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die mittlere Phase Hydroxy-terminiertes Dimethylsiloxan und/oder Phenylmethyl-Siliconöl enthält.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die untere wässrige Phase Salze, Puffersubstanzen, Polymere und/oder organische Lösungsmittel enthält.
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Lösung des Makromoleküls Salze, Puffersubstanzen, Polymere und/oder organische Lösungsmittel enthält.
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Makromoleküle Proteine, RNA, Komplexe von Makromolekülen, Proteinkomplexe, Protein/Ligandenkomplexe, DNA/Ligandenkomplexe, Protein/RNA-Komplexe oder Protein/DNA-Komplexe sind.
14. Kristalle von Makromolekülen, die durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 erhalten werden.

- 22 -

15. Vorrichtung zur Kristallisation von Makromolekülen, bei der eine Vielzahl von Probengefäßen zu einem Probenträger angeordnet sind, wobei der Probenträger einen durchgängigen Rand aufweist, der höher angeordnet ist als die Öffnungen der Probengefäße.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15, wobei in den Probengefäßen jeweils mindestens eine gegenüber dem Boden der Probengefäße erhöhte Ausbuchtung vorhanden ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 15 und/oder 16, wobei der Boden des Probenträgers optisch homogen ist.
18. Dreiphasensystem zur Kristallisation von Makromolekülen, bei dem in einem Gefäß drei flüssige Phasen übereinander vorliegen, wobei diese eine untere wässrige Phase, eine mittlere Phase und eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase sind.
19. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1, der Vorrichtung nach Anspruch 15 oder 16 und/oder eines Dreiphasensystems nach Anspruch 17 zur automatisierten Kristallisation oder zum automatisierten Screening.
20. Strukturen von Makromolekülen, die bei der Analyse von Kristallen gemäß Anspruch 14 ermittelt werden.

- 23 -

Zusammenfassung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Kristallisation von Makromolekülen unter Verwendung eines Gefäßes, enthaltend eine untere wässrige und eine mittlere Phase,

wobei eine wässrige Lösung der Makromoleküle in die mittlere Phase gegeben wird,

wonach eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase über die mittlere Phase geschichtet wird,

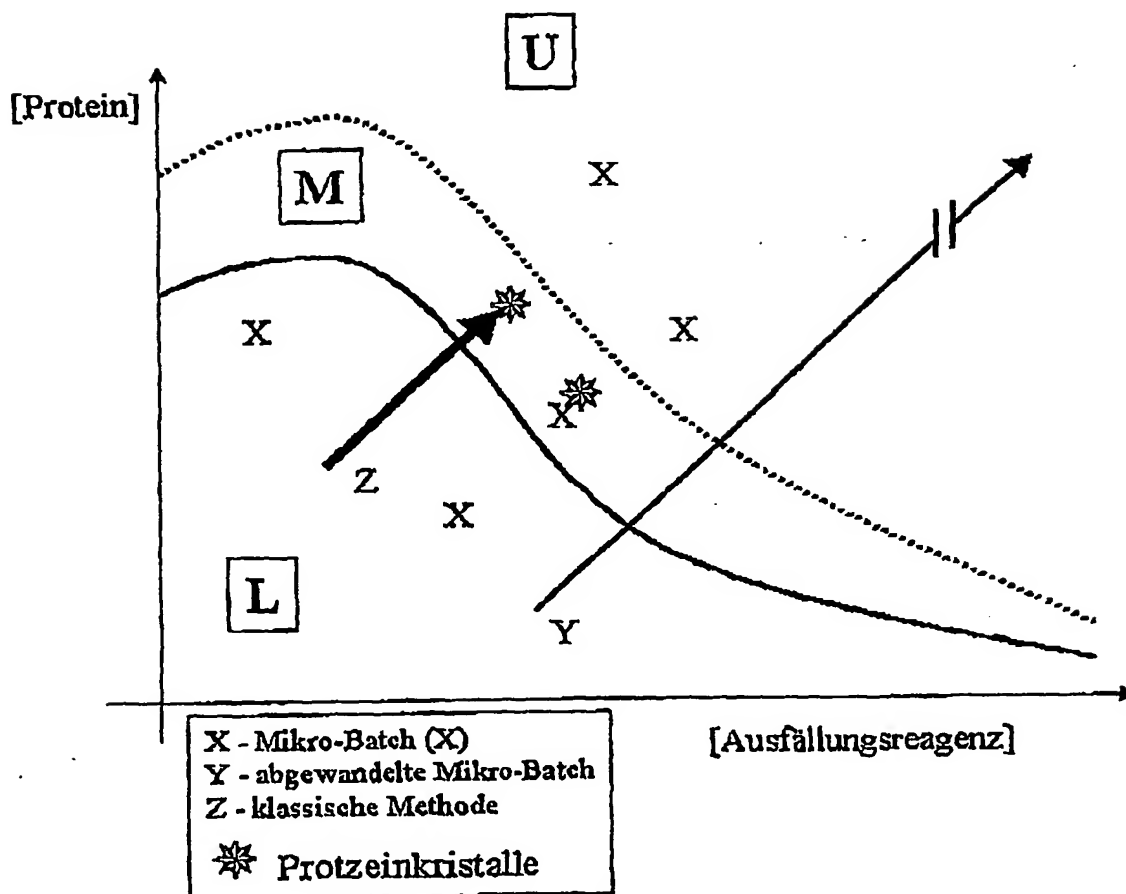
oder

eine obere hydrophobe Phase mit geringerer Dichte als die untere wässrige Phase über die mittlere Phase geschichtet wird,

wonach eine wässrige Lösung der Makromoleküle in die mittlere Phase und/oder obere Phase gegeben wird,

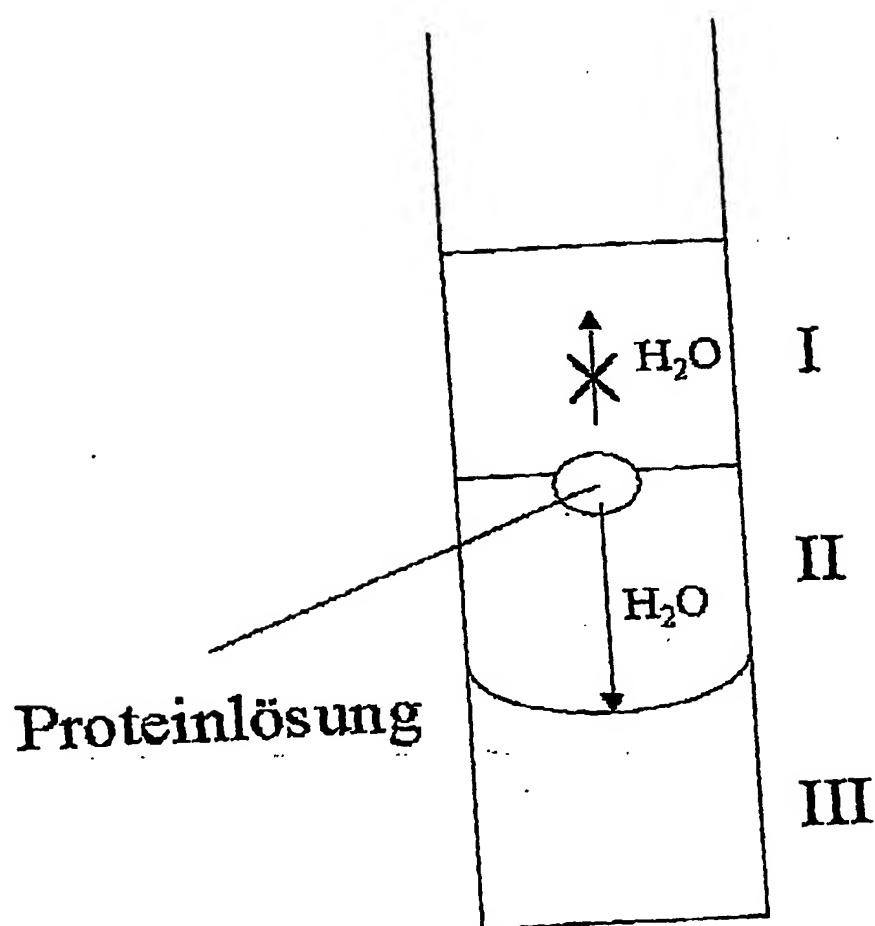
und inkubiert wird. Gegenstand der Erfindung sind auch eine Vorrichtung und ein Dreiphasensystem zur Durchführung des Verfahrens, und die Verwendung als automatisiertes Kristallisationsverfahren.

- 1/8 -



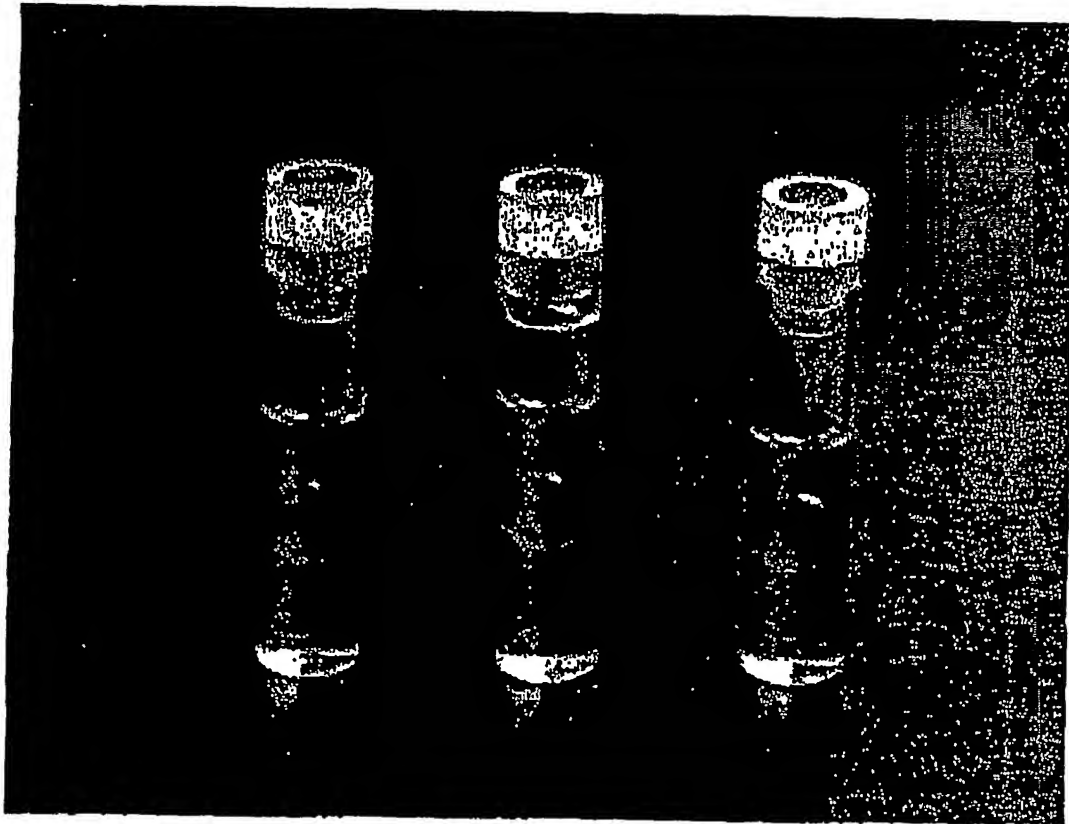
Figur 1

- 2/8. -



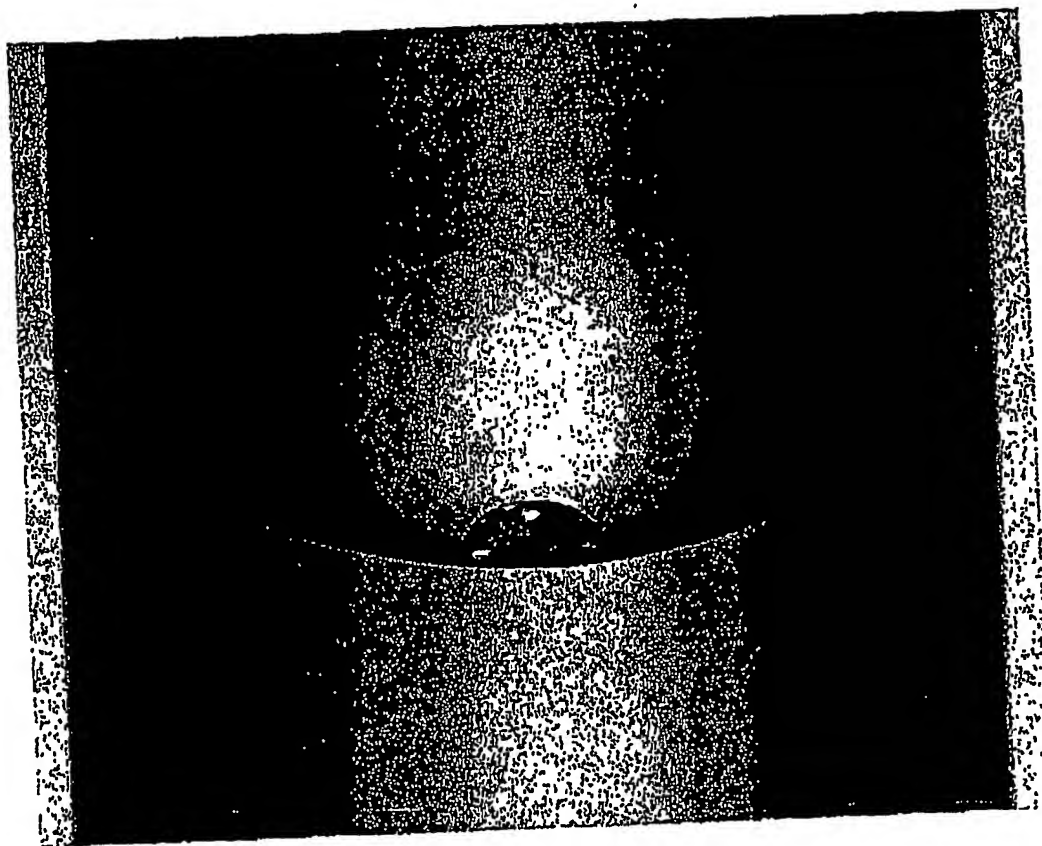
Figur 2

- 3/8 -



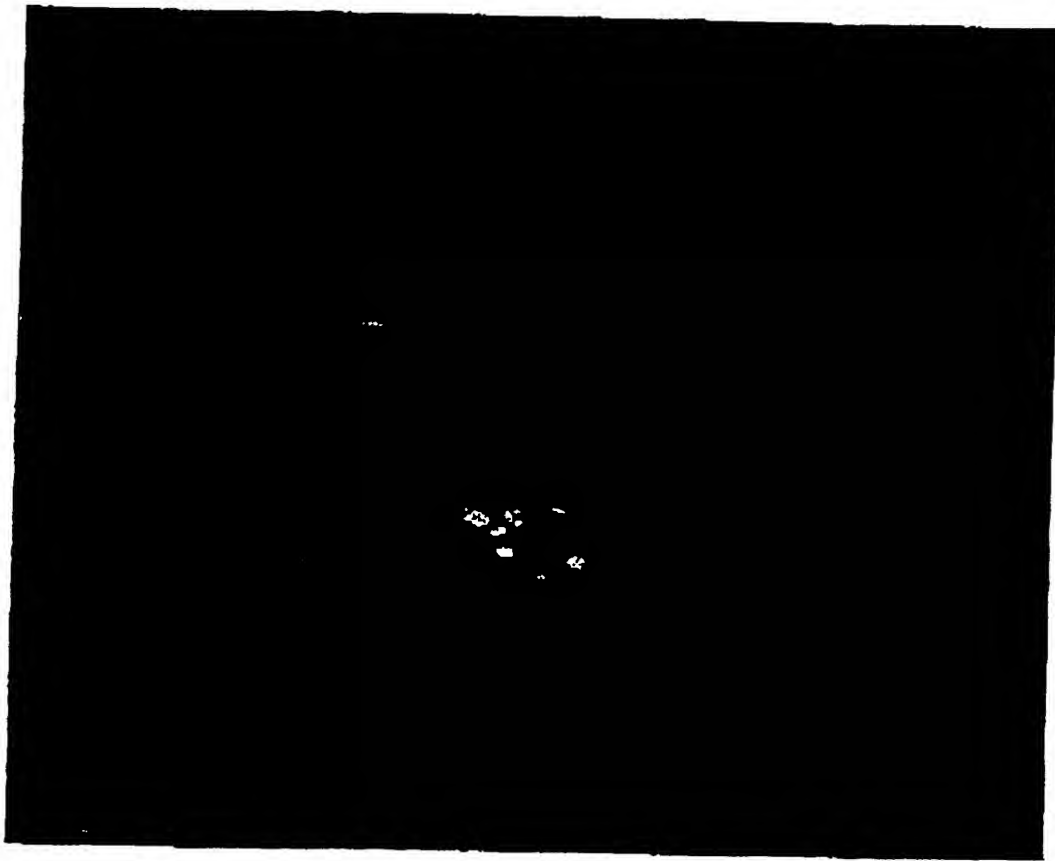
Figur 3

- 4/8 -



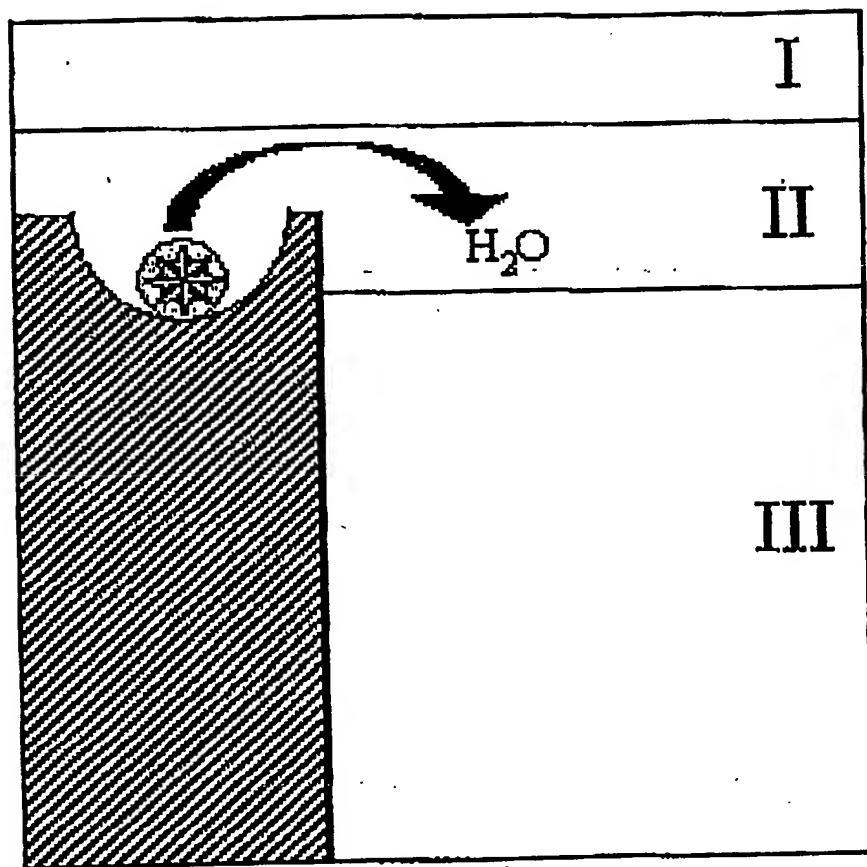
Figur 4

- 5/8 -



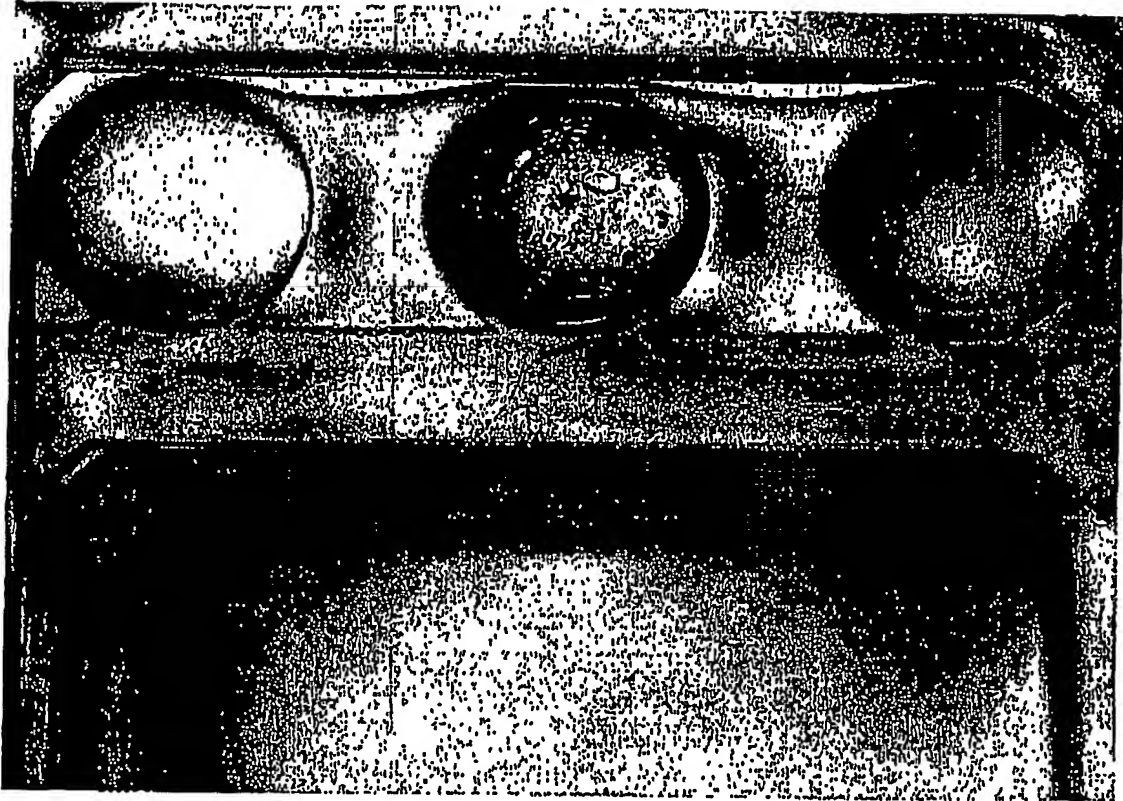
Figur 5

- 6/8 -



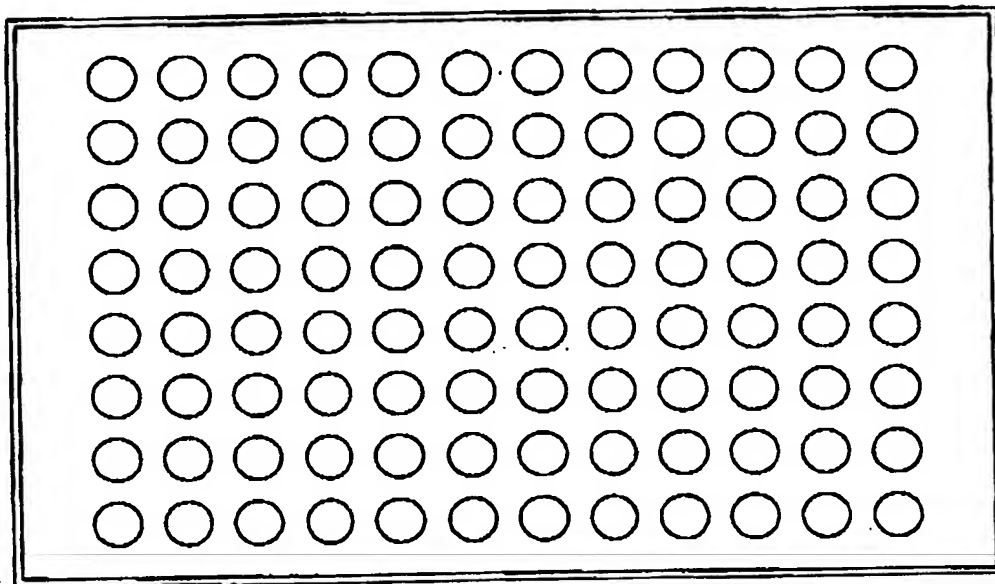
Figur 6

- 7/8 -

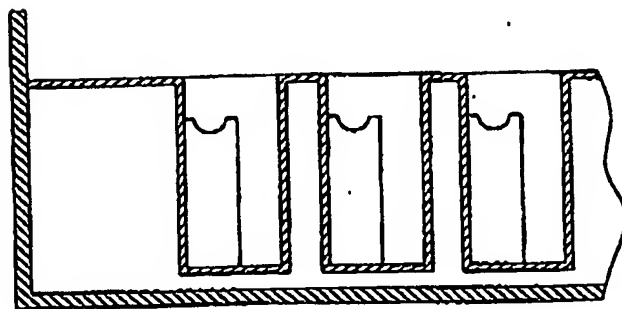


Figur 7

- 8/8 -



Figur 8



Figur 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.